

УДК 613.2:614.31

## СТЕПЕНЬ ВОЗДЕЙСТВИЯ ПИЩЕВЫХ КОНСЕРВАНТОВ НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ, ВЫПОЛНЯЮЩИХ РАЗНУЮ МЕТАБОЛИЧЕСКУЮ ФУНКЦИЮ

Асанова А. А.

научные руководители: канд. биол. наук Есимбекова Е. Н., канд. мед. наук  
Василовский А. М.

*Сибирский федеральный университет*

В настоящее время технология стабилизации и хранения продуктов питания особенно важна, так как современный человек практически лишен возможности потребления неконсервированных продуктов. Пищевая промышленность активно использует разнообразные консерванты, основное действие которых направлено на замедление роста и развития бактерий, плесневых грибов, дрожжей, предотвращение появления неприятного вкуса и запаха [1-2]. При выборе консервантов основным критерием наряду с эффективностью является их безопасность. Однако механизм воздействия консервантов на организм человека на молекулярном уровне остается малоизученным. *Цель работы:* исследование влияния пищевых консервантов на активность ряда ферментов, различающихся по выполняемой метаболической функции.

Для проведения исследования были выбраны консерванты, наиболее часто встречающиеся в составе пищевых продуктов: бензоат натрия (Е 211), сорбат калия (Е 202) и сорбиновая кислоты (Е 200). Диапазон концентраций исследуемых веществ составлял от 0,1 до 10 мг/л. В работе использовали лиофилизированный препарат высокоочищенных ферментов, содержащий люциферазу из рекомбинантного штамма *Escherichia coli* и NADH:FMN-оксидоредуктазу из *Vibrio fischeri*, бутирилхолинэстеразу сыворотки лошадей и трипсин поджелудочной железы свиней (Sigma, США).

О влиянии исследуемых пищевых консервантов на биферментную систему L+R судили по изменению максимальной интенсивности свечения в реакционной смеси следующего состава: 300 мкл 0,05 М калий фосфатного буфера pH 6,8, 2-4 мкл раствора ферментов, 50 мкл 0,0025 % раствора тетрадеканала, 50 мкл 0,4 мМ раствора NADH, 10 мкл 0,5 мМ раствора FMN. Степень воздействия консервантов определяли по величине остаточного свечения  $(I_0/I_k) \cdot 100\%$ , где  $I_k$  и  $I_0$  – интенсивности свечения биферментной системы в присутствии 5 мкл дистиллированной воды (контроль) или исследуемого вещества соответственно. Для определения активности трипсина использовали трехферментную систему NADH:FMN-оксидоредуктаза-люцифераза-трипсин [3]. В реакционную смесь помимо перечисленных компонентов добавляли 10 мкл трипсина. Об изменении активности трипсина судили по изменению константы спада ( $k_{сп}$ ) свечения в присутствии контрольного раствора или анализируемого вещества.  $k_{сп}$  рассчитывали по формуле  $k_{сп} = (\ln(I_1/I_2))/\Delta t$ , где  $I_1$  – максимум интенсивности свечения системы,  $I_2$  – интенсивность свечения системы через заданное время после достижения максимума,  $\Delta t$  – время (в минутах), за которое  $I_1$  достигает  $I_2$ . Активность бутирилхолинэстеразы определяли по скорости распада бутирилтиохолина йодистого во времени, и как следствие изменение оптической плотности смеси, измеренной на длине волны максимального поглощения ( $\lambda=412$  нм). Использовали реакционную смесь следующего состава: 3,5 мл 0,2 мМ 5,5'-дитиобис(2-нитробензойная кислота), 10 мкл бутирилхолинэстеразы, 100 мкл 120 мМ бутирилхолина йодистого.

Степень воздействия веществ на активность ферментов оценивали по величинам  $EC_{20}$  и  $EC_{50}$ , которые равны концентрации консерванта, вызывающей изменение параметра ферментативной реакции на 20 и 50 % соответственно. Регистрацию интенсивности свечения проводили на биолюминометре LUMAT LB 9507 (Berthold Technology, Германия). Измерения оптической плотности проводили на спектрофотометре UVICON 943 (Contron Instruments, Италия).

Согласно принятым в Российской Федерации санитарно-эпидемиологическим правилам и нормативам, максимальный уровень содержания в продуктах бензойной и сорбиновой кислот, а также их солей, не должен превышать 10 мМ. В работе определена степень воздействия данных консервантов на активность ферментов, различающихся по выполняемой метаболической функции.

Наиболее чувствительной к исследуемым веществам оказалась биферментная система NADH:FMN-оксидоредуктаза-люцифераза (L+R). (Рис. 1а). Следовательно консерванты оказывают негативный эффект на функционирование ферментов из класса оксидоредуктаз. Значения  $EC_{20}$  и  $EC_{50}$  для биферментной системы приведены в таблице 1.

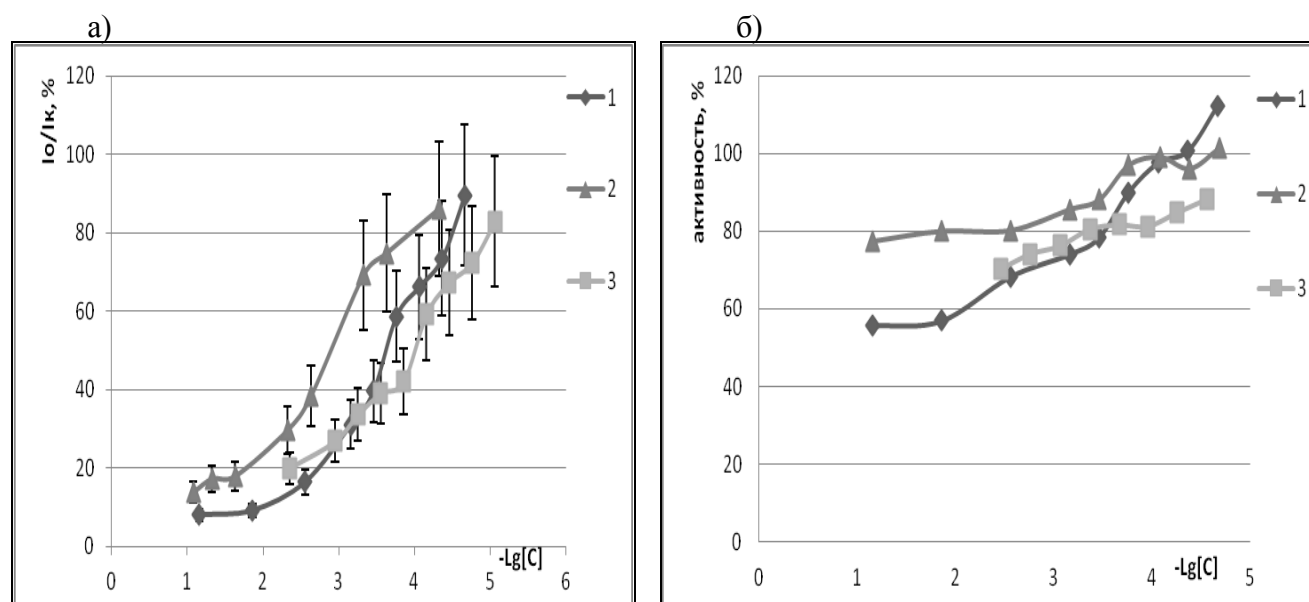


Рисунок 1. Зависимость остаточной интенсивности свечения биферментной системы (а) и относительной активности трипсина (б) от концентрации 1 - бензоата натрия, 2 - сорбата калия, 3 - сорбиновой кислоты.

Трипсин является пищеварительным ферментом и относится к классу гидролаз. В исследованном диапазоне концентраций консервантов максимальное уменьшение относительной активности трипсина составило 45 % и наблюдалось в присутствии бензоата натрия (Рис. 1б). Поэтому для трипсина были получены только значения величины  $EC_{20}$ , которые как видно из таблицы 1, не превышают предельно допустимых значений содержания бензоата натрия, сорбата калия и сорбиновой кислоты.

Таблица 1. Полученные значения концентраций для бензоата натрия, сорбата калия и сорбиновой кислоты.

	L+R		Трипсин	BhE
	EC50, mM	EC20, mM	EC20, mM	EC20, mM
Бензоат натрия	0,35	0,08	0,04	–*
Сорбат калия	0,15	0,02	1,40	–*
Сорбиновая кислота	0,008	0,0007	0,04	–*

Бутирилхолинэстераза является гидролазой карбоновых кислот, в основном осуществляет гидролиз бутирилхолина. На активность бутирилхолинэстеразы значительного эффекта исследуемые консерванты не оказали (Рис.2).

В ходе данной работы было показано, что бензоат натрия, сорбат калия и сорбиновая кислота могут оказывать значительный ингибирующий эффект на функциональную активность ферментов. В наибольшей степени воздействию консервантов подвержены ферменты из класса оксидоредуктаз. Наиболее чувствительны оксидоредуктазы к действию сорбиновой кислоты.

Работа поддержана Правительством Российской Федерации в рамках государственной программы по привлечению ведущих ученых в российские учреждения высшего профессионального образования (контракт No 11. G34.31.058) и Федеральным агентством по науке и инновациям (контракт No 02.740.11.0766).

#### Список литературы

- 1) Гумеров, Т. Ю. Использование бензоата натрия в качестве пищевой добавки E211 в процессе приготовления овощных салатов/ Т. Ю. Гумеров, И. А. Илларионова, О. А. Решетник// Вестник Казанского технологического университета. – 2010. - №11. – С. 269-275.;
- 2) Люк, Э. Консерванты в пищевой промышленности / Э. Люк., М. Ягер. – 3-е изд. Пер. с нем. – Спб.: Гиорд. – 2000.
- 3) Петушков В.Н., Кратасюк Г.А., Фиш А.М., Гительзон И.И. Способ определения активности протеаз. //Авт.свид. N 1027615, опубл.07.07.83, Бюлл.N 25. С.159.